

# БИОГЕННЫЕ АМИНЫ (ДОФАМИН, СЕРОТОНИН) В ТКАНЯХ НЕКОТОРЫХ ТРЕМАТОД СЕМ. PLAGIORCHIDAE

Н. Б. Теренина

Лаборатория гельминтологии АН СССР, Москва

В гомогенатах тканей трематод сем. Plagiorchidae Lühe, 1901 из легких лягушки *Rana temporaria* спектрофлуориметрически идентифицированы дофамин и серотонин. Обнаружено различие в содержании веществ в двух фрагментах тела — головном, включающем две присоски, и области, расположенной за брюшной присоской. Норадреналин не был выявлен. Обсуждается вопрос о возможной функции дофамина и серотонина у трематод.

При исследовании биогенных аминов в гомогенатах тканей ряда представителей трематод идентифицированы норадреналин, дофамин и серотонин. Дофамин обнаружен у всех изученных трематод — *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*, *Fasciola hepatica*, *Paragonimus westermani*, *Paragonimus ohirai*; норадреналин — у *S. mansoni*, *S. japonicum*, *F. hepatica*; серотонин — только у шистосом (Bennett e. a., 1969; Chou e. a., 1972; Gianutsos, Bennett, 1977; Terenina, 1978; Seed e. a., 1980).

Гистохимические данные, полученные в отношении *S. mansoni* и *F. hepatica*, показывают, что флуоресценция, специфичная для катехоламинов, наблюдается в области головных ганглиев, в нервных стволах, комиссурах, нервных волокнах, иннервирующих присоски (Bennett, Bueding, 1971; Shishov e. a., 1974; Bennett, Gianutsos, 1977). Серотонин обнаружен в головной области вблизи комиссуры, рядом с нервными стволами, в небольших гранулах, расположенных в паренхиме шистосом (Bennett, Bueding, 1971; Del-Cas e. a., 1979).

Предполагают, что биогенные амины являются вероятными медиаторами нервной системы гельминтов. В то же время многие вопросы, связанные с идентификацией биогенных аминов, их локализацией и функцией у трематод, остаются недостаточно изученными. В представленной работе приводятся результаты спектрофлуориметрического определения дофамина, норадреналина и серотонина в гомогенате тканей трематод сем. Plagiorchidae Lühe, 1901 (роды *Harplometra* Looss, 1899; *Pneumonoeces* Looss, 1902; *Scrjabinoeces* Sudarikov, 1950), паразитирующих в легких лягушки *Rana temporaria*, а также сведения о содержании веществ в различных отделах тела паразитов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на свежих и замороженных (—20°) гельминтах и фрагментах их тела — головном, включающем ротовую и брюшную присоски, и области, расположенной за брюшной присоской. При определении дофамина и норадреналина применяли модифицированные методы Манухина и других (1975), Карлссона, Вальдека (Carlsson, Waldeck, 1958), Лаверти, Тейлора (Laverty, Taylor, 1968) с использованием ионообменной смолы Дауэкс-50w×10 20/50 меш и Дауэкс-50w×4 100/200 меш Na<sup>+</sup> фирмы «Serva». При определении дофамина навеска тканей целых гельминтов или их фрагментов составляла 0.030—0.500 г (5—120 экз.). Размер навески для анализа

норадrenalина в целых червях, головном и каудальном фрагментах был равен соответственно 0.200—0.600 г (30—130 экз.), 0.045—0.140 г (70—120 экз.) и 0.155—0.610 г (70—120 экз.). Ткань гомогенизировали в 2 мл 0.2 М хлорной кислоты с 0.5%-ным ЭДТА. Гомогенат оставляли на 20—30 мин на холоду, затем центрифугировали. Центрифугат нейтрализовали раствором  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  до pH 6—6.5 и пропускали через колонку с ионообменной смолой. Элюцию осуществляли 4 мл 2 М  $\text{HClO}_4$ . Элюат нейтрализовали содой до pH 6.5, разливали в 2 пробирки по 2 мл, куда предварительно помещали 0.5 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера (pH 6.5). Для анализа дофамина в опытную пробирку добавляли 0.15 мл раствора йода (0.02 М  $\text{I}_2$  в 5% KJ), через 4 мин — 0.25 мл щелочного сульфита ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$  2.5%,  $\text{Na}_2$  ЭДТА 1% в 5 М NaOH) и еще через 5 мин — 0.46 мл 5 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Контрольные пробы обрабатывали в обратном порядке. Пробы прогревали 40 мин в кипящей бане и после охлаждения на льду записывали спектры возбуждения и флуоресценции с помощью флуоресцентного спектрофотометра MPF-4 фирмы «Hitachi». Максимум спектра флуоресценции окисленного продукта дофамина соответствует 368 нм, возбуждения — 323 нм.

Для анализа норадrenalина в опытную пробирку последовательно добавляли 0.15 мл раствора йода, затем через 3 мин — 0.5 мл щелочного сульфита и еще через 5 мин — 0.8 мл 5 М  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . Измерение интенсивности флуоресценции проводили через 30 мин (максимум спектра флуоресценции находился при длине волны 480 нм, максимум возбуждения — при 380 нм).

Размер навески при определении серотонина в целых червях, в головном и каудальном фрагментах был равен соответственно 0.300—0.590 г (40—145 экз.), 0.080—0.235 г (80—190 экз.) и 0.400—0.900 г (90—160 экз.). Ткань гомогенизировали в 2 мл 0.1 н HCl, к смеси добавляли 4 г NaCl, 15 мл н-бутанола, 3 мл боратного буфера и встряхивали в течение 30 мин. После центрифугирования оставшуюся бутанольную фазу промывали равным объемом боратного буфера, переносили в другую колбу, содержащую 15 мл гептана и 2.5 мл 0.1 н HCl, и встряхивали 15 мин (Юденфренд, 1965). Для регистрации спектрофлюорометрических характеристик серотонина к 1 мл солянокислого экстракта добавляли 0.3 мл концентрированной соляной кислоты (максимум спектра флуоресценции находился при 535—540 нм, максимум возбуждения — при 295 нм). Конденсацию серотонина с нингидрином проводили по методу Снидера (Snyder e. a., 1965, в модификации Манухина и др., 1975). Для этого общий объем кислой фазы доводили бидистиллированной водой до 4 мл, нейтрализовали содой до pH 6.5 и разливали по 2 мл в две пробирки. В контрольную пробу добавляли 0.3 мл раствора йода, через 10 мин йод нейтрализовали одной каплей 0.1 М раствора сульфита натрия, затем в контрольную и опытную пробы приливали по 0.3 мл 0.1 М раствора нингидрина и помещали в термостат при 75° на 55 мин. Спектры флуоресценции и возбуждения регистрировали не раньше, чем через час после обработки проб. Продукт нингидриновой реакции серотонина имеет максимум спектра флуоресценции при 490—495 нм, возбуждения — при 380 нм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные эксперименты показали, что в экстрактах тканей изучаемых гельминтов содержится вещество, спектральные характеристики которого идентичны спектральным характеристикам дофамина (рис. 1). Содержание вещества в тканях целых червей равно  $1.427 \pm 0.158$  мкг/г сырого веса ткани (табл. 1). В головной части тела концентрация дофамина составляет  $0.420 \pm 0.036$  мкг/г ткани ( $0.35 \pm 0.04$  нг на одного паразита), а в области, расположенной за брюшной присоской —  $1.270 \pm 0.127$  мкг/г ткани ( $7.2 \pm 1.0$  нг на одного паразита) (табл. 2).

После инкубации интактных червей в рауседеле ( $14—16$  ч,  $4 \cdot 10^{-5}$  М) наблюдалось незначительное (в среднем на 10%) снижение концентрации дофамина по сравнению с контролем (табл. 1).

Идентификация серотонина в гомогенатах тканей гельминтов показала, что в головных фрагментах тела содержится вещество, спектральные характеристики которого близки к спектрам серотонина (рис. 2). Содержание ве-

щества составило 4.5—9.4 мкг/г сырого веса ткани (4.8—9.4 нг на одного паразита). В то же время отмечено, что максимум спектра флуоресценции продукта нингидриновой реакции вещества, выделенного из тканевых экстрактов гельминтов (487—493 нм), примерно на 2—3 нм отличается от максимума

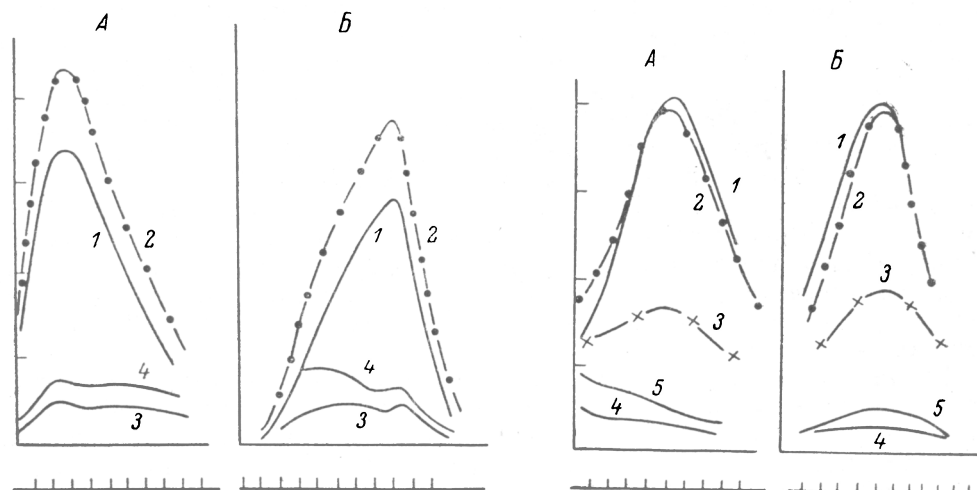


Рис 1. Спектры флуоресценции (А) и возбуждения (Б) стандарта (1), 0.100 мкг дофамина экстракта тканей трематод. 3, 4 — контроль (для стандарта и экстракта ткани).

Рис. 2. Спектры флуоресценции (А) и возбуждения (Б) продукта нингидриновой реакции серотонина и экстракта тканей трематод.

1 — стандарт 0.500 мкг серотонина; 2 — экстракт тканей фрагмента тела, включающего две присоски; 3 — экстракт тканей фрагмента тела, расположенного за брюшной присоской; 4, 5 — контроль к стандарту и экстракту тканей.

соответствующего спектра стандартного раствора серотонина (490—495 нм). В каудальной части тела трематод содержание серотонина незначительно и варьирует от 0.083 до 1.146 мкг/г ткани (0.6—5.5 нг на одного паразита) (табл. 3).

При определении норадреналина достаточно четких спектров возбуждения и флуоресценции экстракта тканей целых трематод, а также их фрагментов, соответствующих спектрам стандартного раствора, обработанного в соответствии с применяемым методом, получить не удалось.

Т а б л и ц а 1

Содержание дофамина в тканях трематод до и после инкубации в рауседице ( $4 \cdot 10^{-5}$  М)

Номер опыта	Контроль		Рауседил	
	мкг/г ткани	нг ла 1 гельминта	мкг/г ткани	нг на 1 гельминта
1	1.975	8.7	1.746	8.8
2	2.500	7.5	1.494	4.9
3	1.453	5.2	1.524	5.8
4	1.333	4.8	1.073	4.2
5	1.402	5.0	0.818	3.9
6	0.828	4.1	1.083	2.9
7	1.298	5.9	1.167	3.5
8	1.940	9.1		
9	1.239	3.5		
10	1.087	4.1		
11	1.643	2.6		
Средняя	$1.427 \pm 0.158$	$5.5 \pm 0.6$	$1.271 \pm 0.124$	$4.8 \pm 0.7$

Т а б л и ц а 2  
Содержание дофамина в двух фрагментах тела трематод

Номер опыта	Область, включающая две присоски		Область за брюшной присоской	
	мкг/г ткани	нг на 1 гельминта	мкг/г ткани	нг на 1 гельминта
1	0.444	0.24	0.773	1.6
2	0.275	0.26	1.175	4.9
3	0.335	0.56	0.706	12.0
4	0.612	0.59	1.178	11.7
5	0.285	0.26	1.774	4.4
6	0.317	0.20	1.761	3.7
7	0.635	0.57	2.040	11.4
8	0.459	0.53	0.855	5.9
9			1.473	11.7
10			0.960	4.8
Средняя	$0.420 \pm 0.036$	$0.35 \pm 0.04$	$1.270 \pm 0.127$	$7.21 \pm 1.04$

Т а б л и ц а 3  
Содержание серотонина у трематод сем. Plagiorchiidae

	Бутанол—НС1		Бутанол—нингидрин	
	мкг/г ткани	нг на 1 гельминта	мкг/г ткани	нг на 1 гельминта
Область, включающая две присоски	$6.840 \pm 0.585$ (8)	$6.9 \pm 0.4$ (8)	$6.220 \pm 0.717$ (7)	$6.2 \pm 0.7$ (7)
Область за брюшной присоской	$0.341 \pm 0.090$ (7)	$1.7 \pm 0.2$ (7)	$0.701 \pm 0.111$ (6)	$4.2 \pm 0.5$ (6)
Целые гельминты	$1.493 \pm 0.472$ (3)	$8.0 \pm 2.5$ (3)	$1.334 \pm 0.271$ (4)	$9.4 \pm 2.8$ (4)

Примечание. В скобках — число экспериментов.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные показали, что в тканях трематод сем. Plagiorchiidae содержится дофамин, концентрация которого на 1 грамм ткани несколько выше, чем у других исследованных трематод. Количество дофамина в головной части гельминта оказывается ниже по сравнению с содержанием вещества в области, расположенной за брюшной присоской.

Согласно гистохимическим данным, локализация катехоламинов у трематод связана с элементами нервной системы. Определение дофамина у фасциол обнаружило наибольшую концентрацию вещества в головной части паразита, т. е. в области скопления нервных структур (Bennett, Gianutsos, 1977; Terapina, 1978). В то же время отмечено, что содержание дофамина остается достаточно высоким в том отделе тела фасциол, где происходит образование яиц, в связи с чем было высказано предположение о возможности участия дофамина в процессе образования склеротиновой оболочки яиц (Gianutsos, Bennett, 1977). Известно, что элементы склеротинообразующей системы — фенолы, фенолоксидазы — имеются в желточных клетках *F. hepatica*, *S. mansoni*, *Haplometra cylindracea*, *Haemotoloechus medioplexus* и других трематод; показана роль фенолоксидазы в образовании оболочки яиц шистосом; приводятся данные, свидетельствующие, что дофамин является хорошим субстратом для фенолоксидазы трематод (Smyth, 1954; Mansour, 1958; Smyth, Clegg, 1959; Bennett e. a., 1978; Burton, 1963; Seed, Bennett, 1978, 1980). Результаты, полученные нами, показывают, что большая часть (95%) определенного у трематод сем. Plagiorchiidae дофамина содержится в области тела, расположенной за брюш-

ной присоской. В связи с этим можно предположить, что значительная часть дофамина у изучаемых гельминтов выполняет немедиаторную функцию и, вероятно, имеет значение в процессе образования склеротиновой оболочки яиц. Если это так, то, возможно, содержание дофамина у различных видов трематод будет коррелировать с их яйцевой продукцией. В связи с обсуждаемым вопросом следует отметить, что в тканях *S. mansoni* обнаружено относительно низкое содержание дофамина. Предполагается, что у этих трематод при образовании склеротиновой оболочки яиц субстратом для фенолоксидазы служит тирозин (Seed e. a., 1980).

Инкубация червей в рауседеле приводит к незначительному снижению концентрации дофамина. Соответствующие эксперименты, проведенные нами ранее на фасциоле, показали, что при содержании червей в рауседеле концентрация дофамина снижается на 40% (Terenina, 1978). Возможно, что механизм освобождения дофамина, локализованного в различных структурах трематод, неодинаков. В связи с этим отмеченные различия обусловлены, вероятно, тем, что относительная доля немедиаторного дофамина у трематод сем. Plagiorchiidae выше, чем у фасциол.

Среди исследованных трематод серотонин выявлен только у шистосом (Bennett e. a., 1969; Bennett, Bueding, 1971; Chou e. a., 1972; del-Cas e. a., 1979). Высказывается предположение, что он может выступать в качестве нейротрансмиттера у этих гельминтов (Barker e. a., 1966; Bennett e. a., 1969; Bennett, Bueding, 1973). В соответствии с полученными нами данными изучаемые трематоды сем. Plagiorchiidae также содержат серотонин. Небольшие расхождения в максимумах спектра флуоресценции продукта нингидриновой реакции экстракта ткани и стандартного раствора связаны, вероятно, с недостаточной очисткой тканевого экстракта гельминтов. Содержание серотонина в головном конце трематод превосходит количества вещества, найденного в остальной части тела, в 10—20 раз. Если серотонин у трематод связан с деятельностью нервной системы, то это различие, возможно, объясняется наличием большого количества нервных структур в головной части гельминтов. Данные о наибольшей концентрации серотонина в головной области (8 мкг/г ткани) получены и в отношении *S. mansoni*. В то же время у этих трематод содержание вещества в области, расположенной за брюшной присоской, остается достаточно высоким (4 мкг/г ткани). Гистохимически показано, что локализация серотонина у шистосом не ограничивается областью расположения нервных структур. В связи с чем предполагается, что, помимо медиаторной, это вещество может выполнять у трематод иные функции (Bennett e. a., 1969; Bennett, Bueding, 1971).

Несмотря на наличие высоких концентраций серотонина у шистосом, способность синтезировать этот амин доказана не была. Вероятно, паразит может пополнять запасы серотонина из организма хозяина (Bennett, Bueding, 1973). Поскольку изучаемые нами трематоды локализуются в легких лягушки, питаются кровью, где содержание серотонина может быть высоким, то не исключена возможность справедливости высказанного предположения и в отношении трематод сем. Plagiorchiidae.

#### Л и т е р а т у р а

- Манухин Б. Н., Бердышева Л. В., Волина Е. В. Одновременное определение катехоламинов и серотонина после их очистки на ионообменной смоле. — Вопр. мед. химии, 1975, т. 21, вып. 3, с. 317—321.
- Юденфренд С. Ю. Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. Москва, Мир, 1965.
- Barker L. R., Bueding E., Timms A. R. The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. — Brit. J. Pharmacol. Chemother., 1966, vol. 26, p. 656—665.
- Bennett J., Bueding E. Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. — Comp. Biochem. and Physiol., 1971, vol. 39, N 4, p. 859—867.
- Bennett J., Bueding E. Uptake of 5-hydroxytryptamine by *Schistosoma mansoni*. — Molec. Pharmacol., 1973, vol. 9, p. 311—319.
- Bennett J., Bueding E., Timms A. R., Engstrom R. G. Occurrence and levels of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. — Mol. Pharmacol., 1969, vol. 5, N 5, p. 542—545.
- Bennett J., Gianutsos G. Distribution of catecholamines in immature *Fasciola*

- hepatica: a histochemical and biochemical study. *Int. J. Parasitol.*, 1977, vol. 7, N 3, p. 221—225.
- Bennett J. L., Seed J. L., Boff M. Fluorescent histochemical localization of phenol oxidase in female *Schistosoma mansoni*. — *J. Parasitol.*, 1978, vol. 64, N 5, p. 941—944.
- Burton P. R. A histochemical study of vitelline cells, egg capsules and Mehlis' gland in the frog lung-fluke, *Haematoloechus medioplexus*. — *J. Exp. Zool.*, 1963, vol. 154, N 2, p. 247—258.
- Carlsson A., Waldeck B. A fluorometric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). *Acta physiol. scand.*, 1958, vol. 44, Fasc. 3—4, p. 293—298.
- Chou T. C. T., Bennett J., Bueding E. Occurrence and concentrations of biogenic amines in trematodes. — *J. Parasitol.*, 1972, vol. 58, N 6, p. 1098—1102.
- Del-Cas E., Dhainaut-Courtois N., Dhainaut A., Vernes A. Ultrastructural localization of tritiated 5-HT in adult *Schistosoma mansoni*. A preliminary report. — *Biol. Cellulaire*, 1979, vol. 35, p. 321—324.
- Gianutsos G., Bennett J. L. The regional distribution of dopamine and norepinephrine in *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica*. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1977, vol. 58C, N 2, p. 157—159.
- Lavery R., Taylor K. M. The fluorometric assay of catecholamines and related compounds. Improvements and extensions to the hydroxyindole technique. — *Anal. Biochem.*, 1968, vol. 22, N 2, p. 269—279.
- Mansour T. E. Effect of serotonin on phenol oxidase from the liver fluke *Fasciola hepatica* and from other sources. — *Biochim. biophys. Acta*, 1958, vol. 30, p. 492—500.
- Seed J. L., Bennett J. L. Role of tyrosine and phenol oxidase in egg formation in *Schistosoma mansoni*. — In: *Proc. of fourth Internat. Congress of Parasitol.*, Warszawa, 1978, sect. F., p. 57.
- Seed J. L., Bennett J. L. *Schistosoma mansoni*: Phenol oxidase's role in eggshell formation. — *Exp. Parasitol.*, 1980, vol. 49, p. 430—441.
- Seed J. L., Boff M., Bennett J. L. Phenol oxidase activity: induction in family schistosomes by in vitro incubation. — *J. Parasitol.* 1978, vol. 64, N 2, p. 283—289.
- Seed J. L., Kiltz C. D., Bennett J. L. *Schistosoma mansoni*: Tyrosine, a putative in vitro substrate of phenol oxidase. — *Exp. Parasitol.*, 1980, vol. 50, p. 33—34.
- Shishov B. A., Zhuchkova N. I., Terenina N. B. Study of monoaminergic nerve cells in some nematodes and in Trematoda, *Fasciola hepatica*. — In: *Proc. of third Internat. Congress of parasitol.*, Munich, 1974, vol. 3, p. 1503—1504.
- Snyder S. H., Axelrod J., Zeig M. A sensitive and specific fluorescence assay for tissue serotonin. — *Biochem. Pharmacol.*, 1965, vol. 14, p. 831—835.
- Smyth J. D. A technique for the histochemical demonstration of polyphenol oxidase and its application to egg-shell formation in helminths and byssus formation in *Mytilus*. — *Quart. J. Microscop. Sci.*, 1954, vol. 95, p. 139—152.
- Smyth J. B., Clegg J. A. Egg-shell formation in trematodes and cestodes. — *Exp. Parasitol.*, 1959, vol. 8, N 3, p. 286—323.
- Terenina N. B. The determination of catecholamines in *Fasciola hepatica* (Trematoda). — In: *Proc. of Fourth Internat. Congress of Parasitol.*, Warszawa, 1978, sect. F., p. 52—53.

# BIOGENIC AMINES (DOPAMINE, 5-HYDROXYTRYPTAMINE) IN TISSUES OF SOME TREMATODES OF THE FAMILY PLAGIORCHIDAE

N. B. Terenina

## SUMMARY

Dopamine and 5-hydroxytryptamine have been spectrofluorometrically identified in tissue homogenates of trematodes parasitizing the lung of the frog *Rana temporaria*. The concentration of dopamine has been found to range from 0.8 to 2.5  $\mu\text{g/g}$  of wet weight. The head region (including the oral and ventral suckers) contains  $0.420 \pm 0.036 \mu\text{g/g}$  ( $0.35 \pm 0.04 \text{ ng}$  per 1 helminth) of dopamine, its amount is equal to  $1.270 \pm 0.127 \mu\text{g/g}$  ( $7.2 \pm 1.0 \text{ ng}$  per 1 helminth) in the rest of the body. Dopamine is likely to be related not only to the functions of the nervous system but may possibly play a certain part in the egg shell formation of a trematode. The 5-hydroxytryptamine concentration in the helminth head region ( $4.5\text{--}5.9 \mu\text{g/g}$ ) is considerably greater than that in the rest of the body ( $0.083\text{--}1.146 \mu\text{g/g}$ ). Noradrenaline was not detected.